动　物　学　研　究　2012，Feb. 33(1): 14−18　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.01014

慢性吗啡依赖树鼩模型的建立

孙永梅[1,2], 杨建珍[1], 孙华英[1], 马原野[1,*], 王建红[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南　昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要：吗啡是一种有效的镇痛药, 但易使动物产生耐受性和成瘾性。在该实验中, 中缅树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*)连续 7 d, 每天接受三次肌肉注射递增剂量(5、10、15、20 mg/kg 体重)吗啡后对吗啡产生耐受和依赖; 吗啡注射完成后, 腹腔注射纳洛酮(1.25 mg/kg 体重)催瘾, 可诱导其条件性位置厌恶(conditioned place aversion, CPA)及相应吗啡戒断症状的出现。该结果提示树鼩慢性吗啡依赖模型的建立可用于研究吗啡依赖和耐受的生物学机制, 以及减轻戒断症状药物的筛选。

关键词：树鼩; 吗啡; 慢性依赖; 条件性位置厌恶; 戒断症状
中图分类号：Q959.832; Q95-33; Q189　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)01-0014-05

Establishment of tree shrew chronic morphine dependent model

SUN Yong-Mei[1,2], YANG Jian-Zhen[1], SUN Hua-Ying[1], MA Yuan-Ye[1,*], WANG Jian-Hong[1,*]

(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming,* 650223, *China*;

2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: The clinical use of morphine to reduce pain is limited because of its drug tolerance, dependence and addiction. In the present study, the tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) developed morphine tolerance and chronic morphine dependence by morphine injections with increasing doses (5, 10, 15, 20 mg/kg body weight for 7 days). Meanwhile, the naloxone (1.25 mg/kg body weight)-induced conditioned place aversion (CPA) and the withdrawal symptom were also found. The tree shrew model of chronic morphine dependence can be used to investigate the withdrawal symptoms and to select potential withdrawal symptoms reducing drugs in the future.

Key words: Tree shrew; Morphine; Chronic dependence; Conditioned place aversion; Withdrawal symptom

吗啡作为常见的阿片类镇痛药物之一, 被广泛用于临床治疗各种急、慢性疼痛(Ree et al, 1999; Waldhoer et al, 2004; Martell et al, 2007), 但因可能导致的耐受性(tolerance)、依赖性(dependence), 及成瘾性, 其应用受到限制(Ree et al, 1999; Martell et al, 2007)。现代成瘾生物学的一个基本问题是：为什么诸如吗啡、海洛因等的阿片类药物极易导致耐受、依赖和成瘾(Waldhoer et al, 2004)，而药物依赖又会导致药物滥用, 从而引发诸如社会暴力、艾滋病、肝炎传染等一系列社会问题(Leshner, 1997)。通过建立动物模型来研究药物依赖的生物学机制是回答该问题的有效方法。

药物依赖指持续应用药物后, 个体生理状态发生改变, 而停止药物应用后, 个体将产生戒断症状(Ree et al, 1999)。判断动物对某种药物是否产生依赖, 常通过停药后观察戒断症状, 或者注射该药物的受体拮抗剂催瘾等方法。如：吗啡依赖的大、小鼠在注射吗啡 4～8 h 后, 腹腔注射阿片受体拮抗剂纳洛酮会产生明显的戒断症状(Schulteis et al, 2004)。药物戒断后的条件性位置厌恶(conditioned place aversion, CPA)指由戒断所致的厌恶动机/情绪与特定的环境/信号搭配后可建立条件性反射, 当条件化后的对象再次暴露于相同或相似的环境/信号时, 个体所表现出的厌恶/回避行为(Li et al, 2006,

收稿日期：2011-12-19；接受日期：2012-01-05
基金项目：“973”项目((2011CB707800); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-R-11)
*通信作者(Corresponding authors)，E-mail: yuanma0716@vip.sina.com; wangjh@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：孙永梅， 硕士研究生

Xu et al, 2004)。因此, CPA 是一个判断动物是否产生药物依赖及戒断症状的灵敏方法(Azar et al, 2003)。

树鼩属于攀鼩目(Scandentia)树鼩科(Tupaiinae), 虽然其系统分类地位仍有争议, 但它具备一些近似原始灵长类的特征, 说明它与现代灵长类亲缘关系很近(Peng et al, 1991; Sargis, 2004)。因此, 树鼩的慢性吗啡依赖模型较大、小鼠模型能够更好地模拟人类药物依赖及戒断症状。

以树鼩为模型进行的药物研究数据非常有限。Wiens et al (2008)发现由于马来西亚笔尾树鼩(*Ptilocercus lowii*)的特殊代谢系统, 使其在大量饮用含高浓度酒精的花蜜后并不表现醉酒的状态, 且无宿醉行为特征; 而酒精易成瘾的大鼠品系对吗啡也易成瘾(John et al, 1967)。那么, 同属树鼩科的中缅树鼩是否也保留了该特殊代谢系统, 而该系统对成瘾药物吗啡是否也有作用，本文拟通过持续性吗啡注射观察树鼩对吗啡产生的依赖及成瘾状况, 从而探讨树鼩吗啡依赖/成瘾模型的可行性及其在吗啡、酒精成瘾研究方面的应用前景。

树鼩体型小、繁殖快、易饲养，属昼行性动物, 活动高峰为 6:00—9:30 和 15:00—18:30; 视觉发达, 能清楚区别红、黄、绿和灰色, 且红色对其具有最大的刺激阈值(Peng et al, 1991)。

本实验结合树鼩的活动及视觉特征, 采用 CPA 装置, 通过纳洛酮诱导位置厌恶和戒断症状，以探讨其对吗啡的慢性依赖。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只成年健康雄性中缅树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*), 体重 110～146 g, 购于中国科学院昆明动物研究所动物实验中心。动物单笼饲养在 12 h 明暗交替(光照时间 07:00—19:00)的动物房中，室温 (23±1) ℃，自由饮食。所有树鼩在开始实验前, 至少在动物房适应一周, 在此期间每天接受抚摸一次。其中 2 只在 CPA 箱中穿梭次数<2 被剔除, 4 只注射吗啡后死亡, 所以进行 CPA 数据分析的树鼩共 18 只。

1.2 实验药品

盐酸吗啡：针剂, 10 mg/mL, 沈阳第一制药厂, 批号 070802; 盐酸纳洛酮：粉剂, Sigma-Aldrich, 批号 2066110, 注射当天用 0.9%生理盐水配至 1.25 mg/mL。

1.3 实验装置

CPA 箱：箱体为有机玻璃顶盖的木质箱, 两个可以活动的隔板将其分为三个箱体。两侧大箱体(33 cm×33 cm×33 cm), 即条件化匹配箱壁和底板分别为黑色和红色; 中间小箱体(40 cm×17 cm×33 cm), 即选择箱壁和底板黑色和红色各半。箱体上方 1.5 m 高的天花板上悬挂记录动物行为的摄像头, 监控数据传入置于另一房间的电脑中, 以便进行离线分析。

戒断症状记录装置：粉色铁丝笼(39 cm×27 cm×29 cm)一只, 作为树鼩戒断场地; 磁带式摄像机一部, 用于记录树鼩戒断症状。

1.4 行为测试和记录

1.4.1 纳洛酮诱导慢性吗啡依赖树鼩的 CPA CPA 行为训练分为 3 个阶段：条件化前期、条件化期和测试期。训练时间根据树鼩活动规律安排。实验动物分为 3 组：慢性吗啡注射+纳洛酮催瘾组(morphine+naloxone, MN 组)、慢性吗啡注射+生理盐水组(morphine+saline, MS 组)和慢性生理盐水注射+纳洛酮催瘾组(saline+naloxone, SN 组)。其中 MS 组和 SN 组为对照组。

条件化前期(第 1 天～第 5 天, D1～D5)：每天 8:00、14:00 和 20:00, MN 组和 MS 组分别肌肉注射吗啡或者 SN 组肌肉注射等体积生理盐水, 剂量见表 1。注射完毕后动物立即回到饲养笼。每天 16:00 将动物放入除去隔板的 CPA 箱体中, 使其自由活动 15 min。第 4 天和第 5 天的数据作为 CPA 分数基准值。剔除进入任何一个条件化匹配箱的次数<2 的动物, 条件化期(第 6 天, D6)：该天动物的给药方式和时间同条件化前期。但 3 组动物于 16:00 腹腔注射 0.9%生理盐水(1 mL/kg 体重)后被立即限制在非偏爱箱 30 min; 18:00, MN 组与 SN 组腹腔注射纳洛酮(1.25 mg/kg 体重)；而 MS 腹腔注射生理盐水后, 动物被立即限制在偏爱箱 30 min。

测试期(第 7 天, D7)：该天动物的给药方式和时间同条件化前期。16:00, CPA 装置的隔板被移除, 动物在 CPA 箱体中自由活动 15 min, 录像记录其行为。

1.4.2 戒断症状的记录 戒断症状记录(第 8 天和第 9 天, D8 和 D9): D8, 8:00 MN 组和 MS 组树鼩肌肉注射吗啡(25 mg/kg 体重)并立即放回饲养笼中, 4 h 后(12:00), 两组动物腹腔注射生理盐水(1 mL/kg 体重)后放入粉色铁丝笼中记录其行为 15 min, 然后, 12:15 腹腔注射纳洛酮(1.2 5 mg/kg)后再记录其

行为 15 min。D9 对 SN 组树鼩分别记录腹腔注射生理盐水和纳洛酮后的行为, 记录时间同 D8, 与 D8 不同之处是 8:00, SN 组树鼩肌肉注射生理盐水。CPA 行为训练及戒断症状的记录安排详见表 1。

表 1 实验日程和处理因素

Tab. 1 Experiment design and the schedule

日期 Date	MN 组注射 Injection of MN group	MS 组注射 Injection of MS group	SN 组注射 Injection of SN group	CPA 训练和戒断时间安排 The schedule of CPA training and withdrawal	每日吗啡注射剂量(mg/kg 体重×次数) The morphine injection dose per day(mg/kg body weight×times)
D1	M	M	S	每日 16:00 开始条件化前训练 The pre-conditioning training begins at 16:00	5×3
D2	M	M	S		5×3
D3	M	M	S		10×3
D4	M	M	S		15×3
D5	M	M	S		20×3
D6	M	M	S	16:00 开始, 限制在非偏爱侧 30 min	20×3
	S	S	S	The tree shrews were confined in the non-preferring box for 30 min from 16:00	
	N	S	N	18;00 开始, 限制在偏爱侧 30 min The tree shrews were confined in the preferring box for 30 min from 18:00	
D7	M	M	S	16:00 CPA 测试 CPA tests began at 16:00	25×3
D8	M +S, N	M +S, N	S	12:15 MN 组、MS 组注射纳洛酮观察戒断症状 The recording of withdrawal symptoms of MN group and MS group after naloxone injection from 12:15	25
D9			S +S, N	12:15 SN 组注射纳洛酮观察症状 The recording of withdrawal symptoms of SN group after naloxone injection from 12:15	

M: 吗啡(Morphine); N: 纳洛酮(Naloxone); S: 生理盐水(Saline)。

1.4.3 体重监测 行为测试期间, 每天 7:00—8:00 称量所有树鼩体重。

1.5 数据处理

CPA 数据处理：统计动物停留在红色和黑色箱体的时间(秒), 并依据以下公式转化为 CPA 分数 R 值。R(红箱 CPA 分数)=红箱内停留时间/(红箱内停留时间+黑箱内停留时间)。如果 R＞0.50, 表示该动物偏爱红色箱体, 则红箱为条件化期 18:00 的伴纳洛酮箱, 黑箱为非偏爱箱; 若 R＜0.50, 则黑色箱体为伴纳洛酮箱, 红色箱为非偏爱箱。

体重：D1～D5 的数据用于分析和比较, D1 的体重为基准值, 以 Mean±*SD* 表示。

所有统计分析均用 SPSS 16.0 for Windows 进行。CPA 分数以 Mean±*SE* 表示,组内采用配对 *t*-检验, 组间采用独立样本 *t*-检验。$P≤0.05$ 表示在统计上有显著性差异, $P≤0.01$ 表示有极显著差异。

2 结 果

2.1 三组树鼩 CPA 评定结果

MN 组经纳洛酮催瘾后, 对伴纳洛酮箱明显厌恶(t=2.903, P=0.034); 虽然统计上无显著性, MS 组(t=3.18, P=0.13)停留在偏爱箱的时间在条件化后增多; 同样剂量的纳洛酮并没有导致 SN 组厌恶伴纳洛酮箱(t=−2.038, P=0.134) (图 1)。以上数据说明, MN 组树鼩产生厌恶并不是因为该剂量纳洛酮具有使动物产生厌恶的作用, 而是由于纳洛酮诱导了吗啡依赖树鼩产生戒断症状, 进而诱发了对伴纳洛酮侧箱体的厌恶。

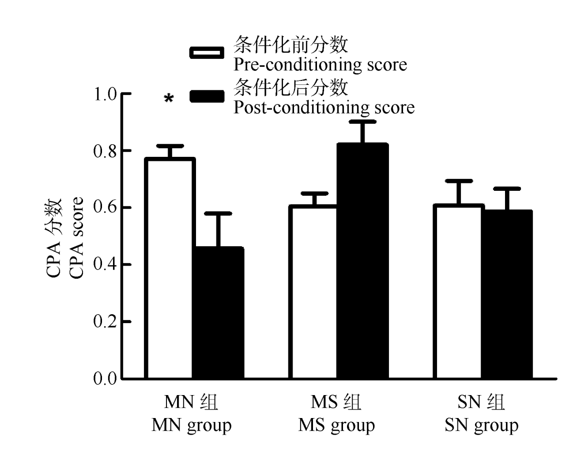


图 1 三组树鼩 CPA 分数

Fig. 1 The CPA score of three tree shrew groups

* P<0.05, MN 组条件化前、后分数比较具显著性差异(MN 组：n=6; MS 组：n=4; SN 组：n=8)。

* P<0.05, MN group CPA score showed significant difference between pre-conditioning and post-conditioning session (MN group: n=6; MS group: n=4; SN group: n=8).

2.2　戒断症状分析与比较

通过 MS 组和 MN 组自身对照以及与 SN 组的组间对照，我们观察到以下戒断症状，并与大鼠的戒断症状进行了比较（表 2）。

表 2　树鼩和大鼠戒断症状比较

Tab. 2　Withdrawal symptoms comparison between rats and tree shrews

	树鼩	大鼠
Similarities 相同点	跳跃 Jumping、舔阴 Cunnilingus、扭体 Writhing、理毛 Grooming、摇头 Shaking head、湿狗样抖 Wet dog shaking、洗脸 Washing face、爪震颤 Paw trembling、甩尾 Drifting	
Differences 不同点	叫声 Yelling：叽呱呱，呱呱 Twee	无(n/a)
	前、后爪拍地 Paw pattering	无(n/a)
	倒立 Head-standing	无(n/a)
	头、尾贴地走 Head grazing, tail grazing	无(n/a)
	无(n/a)	腹泻 Diarrhea
	无(n/a)	吞咽 Swallowing
	无(n/a)	磨牙 Grinding

2.3　吗啡注射后树鼩体重变化

与基准值相比，吗啡组树鼩在注射吗啡 1 d 后体重急剧下降(t=8.698, P<0.001)，随后趋于平稳，表明树鼩对吗啡产生了耐受(图 2)。生理盐水组树鼩体重变化不明显。同时，我们观察到在吗啡注射期间，树鼩的饮食量与注射前、后相比均明显减少。

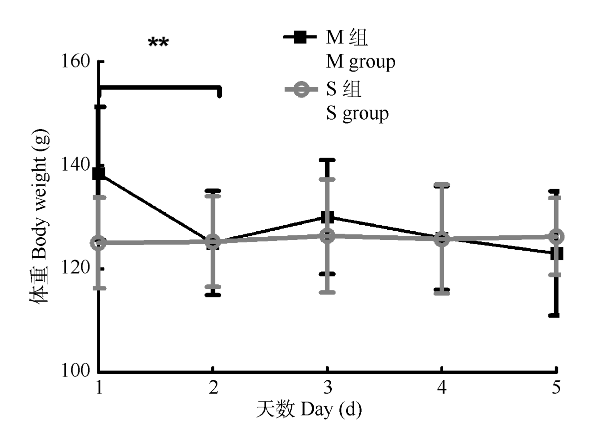


图 2　条件化前期吗啡组(M 组)和生理盐水组(S 组)树鼩体重变化

Fig. 2　Body weight changes in M group and S group during pre-conditioning session

**P<0.01，第 1 次吗啡注射前、后体重比较，有显著性差异。(M 组：n=10, S 组：n=8)。

**P<0.01, body weight showed significant difference between before and after the first morphine injection. (M group: n=10, S group: n=8).

2.4　条件化前期吗啡注射树鼩对红色箱体的偏爱程度

条件化前期第 4、5 天，与生理盐水组相比，吗啡注射树鼩表现出对红色箱体的极显著偏爱(t=3.454, P=0.003)(图 3)。

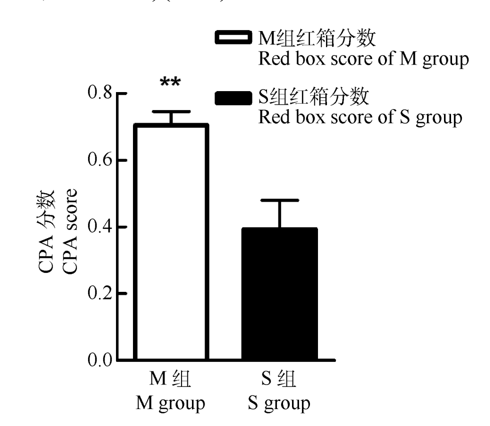


图 3　条件化前期吗啡组(M 组)和生理盐水组(S 组)动物的红色箱体停留分数

Fig. 3　Red box scores of M group and S group in pre-conditioning session

**P<0.01（M 组：n=10, S 组：n=8)。

**P<0.01 (M group：n=10, S group：n=8).

3　讨　论

本实验发现，每天三次注射递增剂量吗啡，树鼩能够对吗啡产生一定的耐受和依赖，通过纳络酮催瘾，可观察到戒断症状，并促使树鼩形成 CPA。

正性和负性强化机制在药物依赖中具重要作用(Tiffany et al, 2004)。药物的奖赏作用是正性强化因素，而药物戒断所产生的戒断症状及厌恶情绪是负性强化因素。在本实验中，正性强化因素是吗啡注射，而负性强化因素是纳络酮催瘾产生的戒断症状，以及与戒断症状相关的环境因素。实验中我们发现：MN 组树鼩与 MS 组、SN 组比较，明显表明出对伴纳洛酮箱体的回避。该结果与啮齿类动物相关报道一致(Marc et al, 2003; Karyn et al, 2010)。这说明树鼩对吗啡产生依赖后用阿片受体拮抗剂纳洛酮催瘾，会由于戒断症状而对催瘾相关的环境线索产生回避行为，且该模型可作为研究药物成瘾及戒断的有效方法之一。

人类阿片类毒品戒断症状包括呕吐、打呵欠、流眼泪、腹泻、腹痛、蚂蚁爬骨的异样感觉、睡眠障碍及抑郁等。树鼩的戒断症状与人类有一定的相似之处。比如：树鼩戒断过程中，叫声和倒立反映其烦躁不安情绪，与人类的心理戒断症状相似；前、后爪拍地，与人类的不宁腿综合征相似；头、尾贴地走，与人类的“静坐不能”症状相似；但因

为动物种属不同，树鼩的某些戒断症状无法和人类相比较，而未观察到树鼩腹泻现象，原因可能是由于树鼩在面对新异环境或刺激时，强烈的应激反应可能使它们对吗啡的耐受增高，同时肠胃功能也能够迅速恢复。在本实验中，树鼩的体重在注射吗啡初始迅速下降，之后便趋于平稳，这从另一方面也说明，树鼩消化道功能的适应能力很强，因而没有产生腹泻症状。该推测需要通过进一步实验验证。另外，催瘾症状与纳洛酮的剂量有关，还需要相关实验探讨不同剂量的纳洛酮是否能诱导树鼩腹泻等症状。

CPA 和戒断症状都是判断动物是否产生药物依赖的指标。药物成瘾的核心特征是强迫性药物使用(Leshner, 1997)。因此，药物依赖模型可以揭示成瘾是怎样从随机地、有控制地用药到强迫性用药。

以往的研究发现，啮齿类动物体重的减轻可以作为吗啡依赖的指标。本实验发现，树鼩在吗啡给药一天后也出现了体重的显著降低，说明体重减轻也可作为其吗啡依赖的指标之一。但是，在之后的给药期间树鼩体重波动不明显，提示其对吗啡产生耐受，而耐受是限制吗啡临床使用的因素之一，因此，中缅树鼩吗啡依赖模型也可用于研究吗啡耐受机制。

中缅树鼩可以对吗啡产生依赖并出现戒断症状的一个重要因素可能是给药方式。我们在前期的预实验中发现，两种恒定剂量(10 mg/kg 体重 和 15 mg/kg 体重)，每天腹腔注射一次，连续 8 d 的给药方式不能建立 CPA。首次注射剂量太高(15 mg/kg 体重)，树鼩死亡率高达 75%，而剂量太低，树鼩又易产生耐受。因而，我们选用每日 3 次递增剂量给药方式，使吗啡药效作用时间延长，并能避免因药量大和药效快导致的动物急性死亡。

由于黑色所给予的安全感，树鼩天生偏爱黑色，但吗啡注射后的树鼩对红色具显著偏爱，这可能是因为吗啡解除了中枢抑制系统的作用，从而使中枢神经系统兴奋而导致树鼩对红色箱的偏爱。

药物伴随(包括戒断时)的环境因素是导致复吸的重要因素之一(Deroche-Gamonet et al, 2004)。因此，纳洛酮诱导的慢性吗啡 CPA 模型不仅可以用于探讨戒断症状在成瘾过程中的作用机理，也可用来探讨相关环境线索是怎样影响复吸的。另外，该模型也可以用来筛选减轻吗啡戒断症状的药物。本研究通过 CPA、戒断症状观察和体重监测等方法，初步建立了中缅树鼩的吗啡依赖模型，且由于树鼩进化地位及脑结构较啮齿类动物均更接近灵长类，该模型具有广大的应用前景。

参考文献：

Azar MR, Jones BC, Schulteis G. 2003. Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal[J]. *Psychopharmacology,* **170**(1): 42-50.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat[J]. *Science,* **305**(5686): 1014-1017.

John R. Nichols JR, Hsiao S. 1967. Addiction liability of albino rats: breeding for quantitative differences in morphine drinking[J]. *Science,* **157**(3788): 561-563.

Leshner AI. 1997. Addiction is a brain disease, and it matters[J]. *Science,* **278**(5335): 45-47.

Li Y, Hao W, Wang XY, Deng H.Q. 2006. Developing the conditioned place aversion rat model produced by naloxone-precipitated withdrawal from chronic morphine dependence[J]. *Chn J Clin Psychol,* **14**(3): 275-278. [李毅, 郝伟, 王绪轶, 邓慧琼, 2006. 慢性吗啡成瘾大鼠纳洛酮催瘾戒断后 CPA 模型的建立[J]. 中国临床心理学杂志，**14**(3): 275-277.]

Martell BA, O'Connor PG, Kerns RD, Becker WC, Morales KH, Kosten TR, Fiellin DA. 2007. Systematic review: opioid treatment for chronic back pain: prevalence, efficacy, and association with addiction[J]. *Ann Intern Med,* **146**(2): 116-127.

Myers KM, Carlezon WA Jr. 2010. D-cycloserine facilitates extinction of naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats[J]. *Biol Psychiatry*, **67**(1)**:** 85-87.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese Tree Shrews[M]. Kunming, China: Yunnan Science and Technology Press. [彭燕章, 叶智彰, 邹如金,王应祥, 田保平, 马原野, 施立明. 1991. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社.]

Sargis EJ. 2004. New views on tree shrews: the role of Tupaiids in primate supraordinal relationships[J]. *Evol Anthropol,* **13**(2): 56-66.

Schulteis G, Morse AC, Liu J. 2004. Conditioning processes contribute to severity of naloxone-precipitated withdrawal from acute opioid dependence[J]. *Psychopharmacology,* **175**(4): 463-472.

van Ree JM, Gerrits MAFM, Vanderschuren LJMJ. 1999. Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine[J]. *Pharmacol Rev,* **51**(2): 341-396.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. 2004. Opioid receptors[J]. *Annu Rev Biochem,* **73**: 953-990.

Wiens F, Zitzmann A, Lachance MA, Yegles M, Pragst F, Wurst FM, holst D, Guan SL, Spanagel R. 2008. Chronic intake of fermented floral nectar by wild tree shrews[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **105**(30): 10426-10431.

Xu W, Luo XJ, Tan BP, Zheng XG, Yang XY, Sui N. 2004. Effect of naloxone on conditioned place aversion in morphine-treated rats[J]. *Chn J Pain Med,* **10**(2): 105-109. [须卫, 罗小景, 谭北平, 邓希耕, 杨晓燕, 隋南. 2004. 纳洛酮诱发吗啡成瘾大鼠 CPA 模型的建立[J]. 中国疼痛医学杂志, **10**(2): 105-109.]